



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt



BI

(10) DE 102 56 898 A1 2004.09.23

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 56 898.7

(51) Int Cl.⁷: C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 29.11.2002

(43) Offenlegungstag: 23.09.2004

(71) Anmelder:

SensLab-Gesellschaft zur Entwicklung und
Herstellung bioelektrochemischer Sensoren mbH,
04347 Leipzig, DE

(72) Erfinder:

Strehlitz, Beate, Dr., 04277 Leipzig, DE;
Stoltenburg, Regina, Dr., 04157 Leipzig, DE;
Gründig, Bernd, Dr., 04318 Leipzig, DE

(74) Vertreter:

Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig &
Schneider, 10179 Berlin

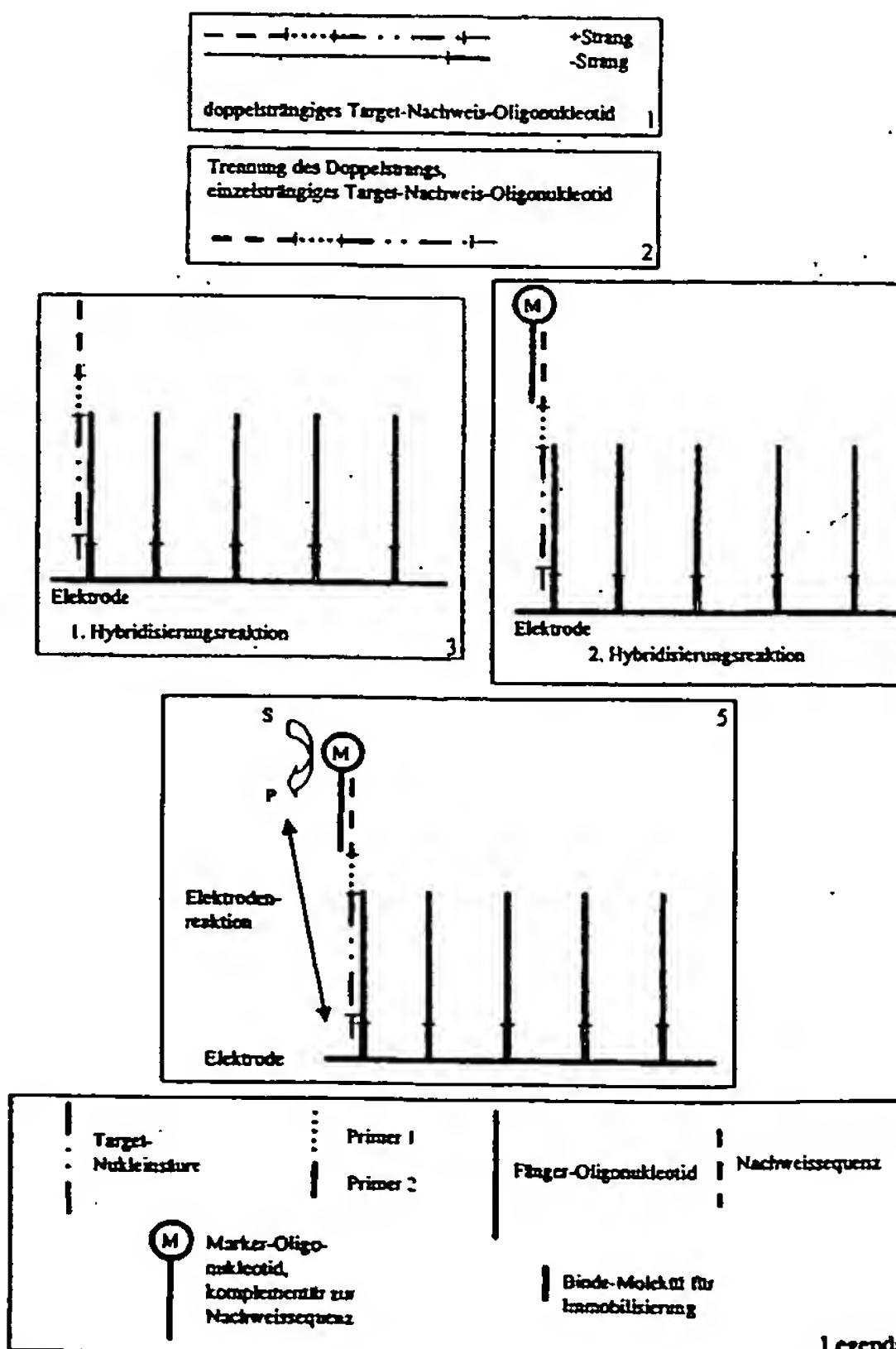
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Elektrochemischer Nachweis von Nukleinsäuren

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur simultanen Detektion unterschiedlicher Target-Nukleinsäuren in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- kovalentes Koppeln einer im Wesentlichen einheitlichen Nachweissequenz an die unterschiedlichen Target-Nukleinsäuren, wodurch Target-Nachweis-Oligonukleotide entstehen, wobei diese zumindest in einem Teilbereich identisch sind,
- in Kontakt bringen der Target-Nachweis-Oligonukleotide mit mindestens einer Elektrode oder einem Elektrodenarray, umfassend targetspezifische, komplementäre Fänger-Oligonukleotide, die auf den Elektroden oder dem Elektrodenarray fixiert sind, wobei die Target-Nachweis-Oligonukleotide in einer ersten Hybridisierungsreaktion an die komplementären Fänger-Oligonukleotide binden,
- Zugabe eines im Wesentlichen einheitlichen Marker-Oligonukleotids, umfassend eine zur Nachweissequenz komplementäre Sequenz und ein Markermolekül, wobei in einer zweiten Hybridisierungsreaktion das Marker-Oligonukleotid an alle in der ersten Reaktion gebundenen Nachweissequenzen bindet,
- Detektion des Markers.



BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Target-Nukleinsäuren in einer Probe mittels eines elektrochemischen Sensors.

[0002] Nukleinsäuren gehören zur Stoffklasse der langkettigen Polynukleotide, die die Träger der genetischen Information darstellen. Als Bausteine des Lebens spielen Nukleinsäuren oder deren Äquivalente eine zentrale Rolle im gesamten Gebiet der Life-Sciences (Lebenswissenschaften) und Chemie.

[0003] Die wiederkehrenden Einheiten von Base, Pentose und Phosphorsäure, aus denen Nukleinsäuren bestehen, werden als Nukleotide bezeichnet. Die Abfolge bzw. die Strukturen dieser wiederkehrenden Einheiten bestimmen die Funktion der Nukleinsäuren und sind für jeden Organismus charakteristisch. Das heißt, mit der Detektion einer bestimmten Nukleotidabfolge der in einer Probe vorkommenden Nukleinsäure, beispielsweise in einer Trinkwasser- oder Lebensmittelprobe, ist es u.a. möglich, zu bestimmen, durch welche Organismen, insbesondere Mikroorganismen, die Probe kontaminiert ist. Bei der Lebensmittelprüfung ist es selbstverständlich auch möglich, nicht nur die Anwesenheit von kontaminierenden Mikroorganismen oder Parasiten nachzuweisen, sondern auch die Reinheit der Lebensmittel zu bestimmen. So kann z. B. bestimmt werden, ob Rind- oder Schweinefleisch, das aus religiösen oder gesundheitlichen Gründen in definierten Lebensmitteln nicht vorhanden sein sollte, in der Lebensmittelprobe vorkommt.

[0004] Gemäß der Schlüsselrolle der Nukleinsäuren im gesamten Bereich der Life-Sciences sind im Stand der Technik eine Vielzahl von Methoden und Vorrichtungen offenbart, mit denen Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide detektiert werden können.

[0005] In einer ersten Näherung ist es möglich, Nukleinsäuren durch Zonenzentrifugation bzw. Gleichgewichtszentrifugation zu bestimmen. Bei bestimmten Nukleinsäuremolekülen kann auch die Analyse mit Hilfe der Elektronenmikroskopie hilfreich sein, um beispielsweise eine virale Nukleinsäure in einer Probe zu detektieren. Derartige Methoden lassen jedoch keine detaillierte Bestimmung der anwesenden Nukleinsäuren zu.

[0006] Eine weitere Nachweismethode ist die Agarose-Gel-Elektrophorese, die in Kombination mit Endo- und Exonukleasen die Untersuchung von Nukleinsäuremolekülen ermöglicht. Zahlreiche weitere Detektionsmöglichkeiten machen sich die Fähigkeit der Denaturierung und Renaturierung von Nukleinsäuren zunutze. Bei diesen Verfahren bildet die Fähigkeit der Nukleinsäuren zur Hybridisierung die Grundlage des Nachweises. Hybridisierung ist die sequenzabhängige Paarung von einzelsträngigen RNA- oder DNA-Molekülen zu einem Doppelstrang – dem Hybrid. Wenn z. B. überprüft werden soll, ob ein Stück DNA aus einem Organismus mit dem eines anderen

Organismus verwandt ist, werden die zu vergleichenden DNA-Abschnitte denaturiert, folgend zur Reassoziation in einem Reaktionsgefäß vereinigt und untersucht, ob sich ein Strang des ersten Organismus mit einem Strang einer DNA des zweiten Organismus zu einem Doppelstrang zusammenfinden kann. Auch komplementäre RNA kann mit DNA ein doppelsträngiges RNA-DNA-Hybrid bilden und dadurch zum Nachweis und zur Analyse von Nukleinsäuren genutzt werden.

[0007] Die WO 00/42217 betrifft ein Nachweisverfahren von Nukleinsäuresequenzen mittels der Detektion eines Hybridisierungseignisses. Dabei dienen einzelsträngige Oligomere mit redoxaktiven Einheiten, die an einer leitfähigen Fläche gebunden sind, als Hybridisierungssonde, wobei sich das Stromsignal an der Elektrode nach der Hybridisierungsreaktion ändert.

[0008] In der WO 01/16361 A2 ist ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit befindlichen Biomolekülen offenbart, wobei Polymere, die eine spezifische Affinität zu den Biomolekülen aufweisen, an der Oberfläche von Elektroden gebunden sind und durch Anlegen einer veränderlichen Spannung die Anlagerung der Biomoleküle durch Messung der unmittelbaren Spannungsänderung bestimmt werden kann.

[0009] Weiterhin sind im Stand der Technik Verfahren beschrieben, bei denen so genannte Fänger-Sequenzen, die an einer Elektrode gebunden sind, komplementär zu einem Teil des Targets sind, und Nachweissequenzen komplementär zu einem anderen Teil des Targets sind, wobei die Nachweissequenzen mit einer signalverstärkenden Einheit verbunden sind, wie z. B. einem Enzym (WO 00/32813, WO 99/67628, WO 99/57319).

[0010] Die genannten Verfahren weisen jedoch mehrere Nachteile auf. Die Verfahren, die sich die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten oder bestimmte optische Eigenschaften zunutze machen, sind relativ ungenau und lassen eine genaue Detektion der Nukleinsäuren nicht zu. Die elektrophoretischen Verfahren, einschließlich der Blottingmethoden, sind sehr teuer und zeitaufwendig. Mit den bekannten elektrochemischen Verfahren ist es nicht möglich, mit einer universellen Nachweisreaktion unterschiedliche Analyten unter Verwendung einer Messreaktion zu erfassen. Das heißt, dass unterschiedliche Analyten jeweils unterschiedlich analysiert oder nachgewiesen werden müssen, so dass das Verfahren zur parallelen Bestimmung verschiedener Nukleinsäuren relativ aufwendig ist.

[0011] Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, bei dem mit einer universellen Nachweisreaktion unterschiedliche Analyten gleichzeitig sicher, effektiv und kostengünstig erfasst werden können.

[0012] Die Erfindung löst dieses technische Problem durch Bereitstellung eines Verfahrens zur simultanen Detektion verschiedener bzw. unterschied-

licher Target-Nukleinsäuren in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- kovalentes Koppeln einer im Wesentlichen einheitlichen Nachweisequenz an die unterschiedlichen Target-Nukleinsäuren, wodurch Target-Nachweis-Oligonukleotide entstehen, wobei diese zumindest in einem Teilbereich identisch sind,
- in Kontakt bringen der Target-Nachweis-Oligonukleotide mit mindestens einer Elektrode oder einem Elektrodenarray umfassend targetspezifische, komplementäre Fänger-Oligonukleotide, die auf den Elektroden oder dem Elektrodenarray fixiert sind, wobei die Target-Nachweis-Oligonukleotide in einer ersten Hybridisierungsreaktion an die komplementären Fänger-Oligonukleotide binden,
- Zugabe eines im Wesentlichen einheitlichen Marker-Oligonukleotids umfassend eine zur Nachweisequenz komplementäre Sequenz und ein Markermolekül, wobei in einer zweiten Hybridisierungsreaktion das Marker-Oligonukleotid an alle in der ersten Reaktion gebundenen Nachweisequenzen bindet,
- Detektion des Markers.

[0013] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können daher mehrere verschiedene Target-Nukleinsäuren parallel bzw. simultan unter Nutzung einer einheitlichen Nachweisreaktion detektiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann selbstverständlich mit anderen Verfahren zur Probenvor- oder -nachbereitung kombiniert werden. Insbesondere kann die nachzuweisende Nukleinsäure – beispielsweise eine DNA – zunächst denaturiert und folgend eine spezifische Region dieser Nukleinsäure mittels PCR vervielfältigt werden. Diese spezifische Region ist ein charakteristischer Sequenzbestandteil der zu detektierenden Nukleinsäure. Erfindungsgemäß ist es in einem ersten Verfahrensschritt möglich, mittels entsprechender Primerpaare diese spezifischen Regionen der zu detektierenden Nukleinsäuren in einer PCR zu amplifizieren. Einer der Primer ist dabei z. B. an seinem 5'-Ende mit einer nichtprimenden Nachweisequenz modifiziert. So ist gewährleistet, dass alle amplifizierten Nukleinsäurefragmente mit einer einheitlichen Nachweisequenz verlängert sind, intern jedoch die targetspezifischen Regionen der ursprünglich zu detektierenden Nukleinsäuren enthalten. Sofern die zu untersuchende Probe für das erfindungsgemäße Verfahren auf diese Weise vorbereitet wurde, werden beide Stränge der aus der PCR hervorgegangenen dsDNA getrennt. Der +Strang, der erfindungsgemäß auch als einzelsträngiges Target-Nachweis-Oligonukleotid bezeichnet werden kann, wird dann in einem weiteren Verfahrensschritt mit der Elektrode oder einem Elektroden-Array in Kontakt gebracht. Jede Elektrode ist so aufgebaut, dass sie eine für einen bestimmten Abschnitt der Target-Nukleinsäuren spezifische und komplementäre

Sequenz trägt. Demgemäß sind diese Target-Nukleinsäure spezifischen Sequenzen, die wegen ihrer Funktion auch als Fänger-Oligonukleotide bezeichnet werden können, an den Elektroden immobilisiert. Dabei ist es vorteilhafterweise nicht erforderlich, dass die Fänger-Oligonukleotide in ihrer Länge der vollständigen nachzuweisenden Target-Nukleinsäure im Target-Nachweis-Oligonukleotid entsprechen. Die Fänger-Oligonukleotide hybridisieren jeweils mit den komplementären Bereichen der Target-Nukleinsäure im Target-Nachweis-Oligonukleotid in einer ersten Hybridisierungsreaktion, so dass eine Bindung untereinander und somit an der Elektrode erfolgt. Im Ergebnis dieser ersten Hybridisierungsreaktion hat sich demgemäß auf der Elektrode ein Hybrid aus Target-Nachweis-Oligonukleotid und dem Fänger-Oligonukleotid ausgebildet, welches außerdem die durch den vorgeschalteten Verfahrensschritt eingefügte Nachweisequenz umfasst.

[0014] Nach dieser ersten Hybridisierungsreaktion an den Elektroden ist eine Sortierung der Target-Nachweis-Oligonukleotide und somit eine Zuordnung zu einzelnen Elektroden im Array erfolgt.

[0015] In einem weiteren Verfahrensschritt werden einheitliche Marker-Oligonukleotide zugegeben. Diese können mit den komplementären Nachweisequenzen in den Target-Nachweis-Oligonukleotiden in einer zweiten Reaktion hybridisieren, sofern sich auf den Elektroden die Hybride aus Fänger-Oligonukleotid und Target-Nachweis-Oligonukleotid gebildet haben. Das heißt, die Marker-Oligonukleotide und somit die an diesen befindlichen Markermoleküle werden genau auf den Elektroden angekoppelt, auf denen in der ersten Hybridisierungsreaktion die Target-Nachweis-Oligonukleotide an komplementäre Fänger-Oligonukleotide binden konnten. Im Anschluss an diese zweite Hybridisierungsreaktion kann nun in Abhängigkeit vom verwendeten Markermolekül mit einer einheitlichen elektrochemischen bzw. biochemischen Nachweisreaktion der Marker detektiert werden.

[0016] Der Marker kann beispielsweise ein redoxaktives Molekül oder ein Enzym sein, wobei durch eine Reduktion bzw. Oxidation des Markers selbst oder durch die Reduktion oder Oxidation von Substraten bzw. Produkten in einer Enzymreaktion der Marker direkt oder indirekt detektierbar ist. Dem Fachmann sind weitere Marker bekannt, die durch Enzymreaktionen direkt oder indirekt bestimmt werden können. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass redoxaktive Markermoleküle verwendet werden, die bewirken, dass die Bindungsreaktion der Marker-Oligonukleotide an die Nachweisequenzen in den Target-Nachweis-Oligonukleotiden, also die zweite Hybridisierungsreaktion, zu einer Spannungs- oder Stromänderung führt, und daher z. B. durch Impedanzmessung, durch Square Wave-Voltammetrie und/oder Differenzial-Puls-Voltammetrie das zweite Hybridisierungsereignis bestimmt werden kann. Durch das Anlegen einer Spannung und/oder eines Stroms an den Elektroden und die Mesung der zwei-

ten Hybridisierungsreaktion, die eine unmittelbare Änderung der Spannung und/oder des Stroms an den betreffenden Elektroden bedingt, können die in der Probe befindlichen Target-Nachweis-Oligonukleotide detektiert werden. Dem Fachmann sind verschiedene Formen der Ausgestaltung solcher Verfahren bekannt. Es ist beispielsweise möglich, dass die Messung der zweiten Hybridisierungsreaktion über eine aufgeprägte Änderung eines Gleichspannungssignals mit bestimmter Geschwindigkeit innerhalb eines bestimmten Potentialbereichs und Messung des daraus resultierenden Gleichstromsignals erfasst wird, beispielsweise als zyklovoltammetrische Messung. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die zweite Hybridisierungsreaktion über ein Wechselstromsignal phasensensitiv bestimmt wird, insbesondere so, dass das Wechselstromsignal einem zyklischen Gleichstromsignal aufgeprägt ist.

[0017] Die erfolgreiche Hybridisierungsreaktion wird also u.a. durch elektrochemische Effekte erkennbar, die in vielen Fällen auch zu einer quantitativen Analyse nutzbar sind.

[0018] Unter Immobilisierung im Sinne der Erfindung sind alle Methoden zur Einschränkung der Beweglichkeit und Löslichkeit von Nukleinsäuren, insbesondere von den Fänger-Oligonukleotiden, auf chemischen und/oder physikalischen Wegen zu verstehen. Die Immobilisierung kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen, wie der Bindung der Oligonukleotide an Elektrodenflächen, durch Festhalten im Netzwerk einer polymeren Matrix oder Umschließen durch Membranen. Weiterhin ist es selbstverständlich möglich, die Oberfläche der Elektroden mit Poly-L-Lysinen, Aminosilanen, Aldehydsilanen, Epoxy-Gruppen, Gold, Streptavidin, reaktiven Gruppen, Polyacrylamid-Pads, immobilisierter Nitrocellulose, aktivierten Aldehyden, Agarose-Aldehyd-Gruppen und/oder Tresyl-Gruppen zu beschichten. Durch derartige Substratoberflächenbehandlungen ist es vorteilhafterweise möglich, die Haltbarkeit und die Bindungskapazität der Oberfläche der Elektroden so zu verbessern, dass die Fänger-Oligonukleotide sehr gut und stabil über einen längeren Zeitraum immobilisiert werden können. Durch die Immobilisierung der Oligonukleotide (Fänger-Oligonukleotide) kann die Elektrodenoberfläche nach dem Prozess der Interaktion mit der biologischen Probe leicht wieder regeneriert und somit wiederverwendbar werden, indem die über Hybridisierung gebundenen Nukleinsäuren wieder abgelöst werden, die Immobilisierung der Fänger-Oligonukleotide aber erhalten bleibt. Die Bindung bzw. die Immobilisierung der Oligonukleotide an den Elektroden kann durch direkte Trägerbindung und durch Quervernetzung erfolgen. Die Trägerbindung bzw. Quervernetzung erfolgt gemäß der Erfindung insbesondere ionisch/adsorptiv oder durch kovalente Bindung. Die Quervernetzung im Sinne der Erfindung ist eine Vernetzung der Detektionsmoleküle, das heißt der Fänger-Oligonukleotide, untereinander oder mit anderen Polymeren. Bei der Immobilisierung

durch Einschluss werden die Oligonukleotide in Gelstrukturen bzw. in Membranen so eingeschlossen, dass eine Interaktion mit den nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren nach wie vor möglich ist.

[0019] Im Weiteren können Temperaturerhöhungen benutzt werden, um durch Hybridisierung entstandene doppelsträngige Nukleinsäure-Bereiche wieder aufzutrennen. Im Falle von Nukleinsäure-Molekülen, die an Elektrodenoberflächen immobilisiert sind, wie den Fänger-Oligonukleotiden, kann z. B. eine vorübergehende Temperaturerhöhung bis kurz unterhalb der Siedetemperatur des Wassers dazu dienen, alle hybridisierten Target-Nachweis-Oligonukleotide und Marker-Oligonukleotide von der Elektrodenoberfläche zu entfernen und diese dadurch für den nächsten Erkennungsvorgang zu regenerieren. Diese Vorgehensweise zur Regeneration der Elektrodenoberfläche macht häufig wiederholte Temperaturänderungen zwischen einer oberen Temperatur, bei der die komplementären Partner getrennt werden, und einer unteren Temperatur (meist nahe der Zimmertemperatur), bei der eine Hybridisierung möglich ist, notwendig. Beide Grenztemperaturen müssen vom Fachmann durch Routineversuche eingestellt werden. Chemische Regenerierungsschritte, die ebenfalls benutzt werden können, beruhen auf der Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. durch Harnstoff, NaOH oder Formamid.

[0020] Das Ablegen der Fänger-Oligonukleotide auf den Elektroden für deren Immobilisierung kann zum Beispiel mit physikalischen oder chemischen Methoden erfolgen. Unabhängig von der Art der zu immobilisierenden Oligonukleotide (spezifische Nukleotidabfolge) können verschiedene Wege verfolgt werden, wie z. B.:

1. Ablegen und Immobilisieren von zuvor synthetisierten Fänger-Oligonukleotiden an definierten Positionen eines funktionalisierten Elektrodenmaterials. Hierfür können sowohl Spotting- als auch Druckverfahren eingesetzt werden. Unter Spotting versteht man Verfahren, bei denen Flüssigkeitstropfen abgelegt werden, wobei durch Oberflächenwechselwirkung und Trocknen im Wesentlichen runde Spots entstehen. Andere Druckverfahren ermöglichen das Aufbringen des Immobilisats in definierten Flächen auf der Oberfläche. Bevorzugt werden die Fänger-Oligonukleotide – durch Contact Tip Printing, Ring and Pin Printing, Nanopipetting, Buble Jet Printing, TopSpot Printing, Micro Contact Printing, Micro Fluidic Networks-Methoden, Photolithographic Activation-Verfahren, Photoresist Lithography, Electrochemical Focusing und/oder Micro Wet Printing immobilisiert.

2. In situ-Synthese der Fänger-Oligonukleotide an definierten Positionen der Elektroden durch sukzessive Kopplung monomerer Synthesebausteine.

[0021] Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Be-

zeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches oder chemisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme erfolgt insbesondere so, dass die entnommene Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge, die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z. B. Trinkwasser, Lebensmittel, Blut, transplantierte Organe u. a., zulässt. Für die Untersuchung können die Proben durch Mischen, Zerteilen, Zerkleinern, Zugabe von Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung der Proben bekannt.

[0022] Selbstverständlich kann es auch vorgesehen sein, dass die Probe so entnommen wird, dass sie keinem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Eine Probe können alle biologischen und nichtbiologischen Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten, z. B. Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit und andere, sowie Trink- und Badewässer, Umweltabwässer, Bioreaktorenflüssigkeiten, Lebensmittelinhaltstoffe, Gefahrenstoffe u.v.a. mehr.

[0023] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung erfolgt in einem ersten Verfahrensschritt das kovalente Binden der einheitlichen Nachweisequenz an die in einer Probe befindlichen, potentiellen Target-Nukleinsäuren in einer PCR mit entsprechenden Primern, wobei einer der Primer an seinem 5'-Ende mit einer nichtprimenden Nachweisequenz modifiziert ist. Die Auswahl der Primer richtet sich nach der Art der nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren. Beispielsweise können mit Hilfe so genannter Universalprimer Regionen der 16S rDNA aus Mikroorganismen amplifiziert werden. Diese Universalprimer sind komplementär zu den hoch konservierten Bereichen der 16S rDNA, um eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen zu erfassen. Gleichzeitig flankieren sie einen Bereich der 16S rDNA, der für die jeweils verschiedenen Mikroorganismen spezifisch ist. Die auf den Elektroden immobilisierten Fänger-Oligonukleotide werden aus diesen spezifischen Bereichen gewählt und können somit ganz bestimmte Mikroorganismen detektieren. Neben den Universalprimern können auch spezifische Primer in der PCR eingesetzt werden, um beispielsweise Bereiche aus Genen zu amplifizieren, die charakteristisch für bestimmte Mikroorganismen oder Mikroorganismengruppen sind. Unabhängig jedoch von der Art der gewählten Primerpaare wird in jedem Fall durch die Modifizierung eines Primers an seinem 5'-Ende mit der nichtprimenden Nachweisequenz eine dsDNA amplifiziert, welche nun sowohl die targetspezifischen Sequenzen enthält, als auch die einheitliche Nachweisequenz. Für den eigentlichen Detektionsschritt an der Elektrode wird aus dem doppel-

strängigen PCR-Produkt das einzelsträngige Target-Nachweis-Oligonukleotid gewonnen. Dem Fachmann sind verschiedene Verfahrensweisen diesbezüglich bekannt.

[0024] Das Target-Nachweis-Oligonukleotid wird anschließend mit der modifizierten Elektrodenoberfläche in Kontakt gebracht. In einer ersten Reaktion können die targetspezifischen Sequenzen des Target-Nachweis-Oligonukleotids mit den komplementären Sequenzen des auf der Elektrode immobilisierten Fänger-Oligonukleotids hybridisieren. In einer nachfolgenden zweiten Hybridisierungsreaktion kann nun das einheitliche Marker-Oligonukleotid an die komplementäre Nachweisequenz im zuvor entstandenen Hybrid binden. Das Marker-Oligonukleotid enthält seinerseits ein Markermolekül, mit Hilfe dessen der gebildete Oligonukleotid-Komplex auf der Elektrode elektrochemisch nachgewiesen werden kann.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann als Marker ein redoxaktives Molekül oder ein Enzym eingesetzt werden. Im Sinne der Erfindung kann der Marker demgemäß ein redoxaktives Molekül sein, wie beispielsweise ein Farbstoff aus den Stoffgruppen der Phenazine, Phenothiazine, Phenoxyazine, Indigosulfonate, Viologene oder Triarylmethan-Farbstoffe, der an der entsprechend polarisierten Elektrode ein Stromsignal bewirkt. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass der Marker ein Enzym ist, das bei einer Reaktion ein Substrat zu einem Produkt umsetzt, wobei die verbrauchten Substrate/Cosubstrate und/oder die gebildeten Produkte so aufgebaut sind, dass sie in einer elektrochemischen Reaktion an der Elektrode gemessen werden können. Derartige Verfahren sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt. Mit Vorteil ist es selbstverständlich weiterhin möglich, an diese erste Enzymreaktion eine zweite Enzymreaktion zu koppeln, die vorteilhafterweise zu einer Signalverstärkung führen kann. Bevorzugt ist hierfür als Markerenzym eine saure und/oder alkalische Phosphatase oder Beta-Galaktosidase, die bei der Hydrolyse eines geeigneten Substrats (z. B. Phenylphosphat) Phenol generiert. Auf einer mediatormodifizierten Elektrodenoberfläche kann gemäß der Lehre Kotte et al. „Analytical Chemistry 67“ (1995) Tyrosinase immobilisiert werden. Tyrosinase katalysiert die Oxidation von Phenol zu Catechol und in einem zweiten Reaktionsschritt zu o-Chinon. Der aufgrund der verwendeten Polarisationsspannung der Elektrode in reduzierter Form vorliegende Redoxmediator reduziert o-Chinon wieder zu Catechol, so dass es vorteilhafterweise für einen weiteren Reaktionsschritt wieder zur Verfügung steht. Diese zyklische Reaktion führt zur Signalverstärkung und ermöglicht dadurch die Erfassung sehr kleiner Messsignale. Der Marker kann erfindungsgemäß jedoch auch so aufgebaut sein, dass er einen markierten Antikörper umfasst, der beispielsweise durch Radioimmuntests detektiert werden kann.

[0026] In einer weiteren bevorzugten Ausführungs-

form der Erfindung sind die Elektroden als Arbeitselektroden auf einem Array oder Träger angeordnet. Die Arbeitselektroden können beispielsweise bevorzugt aus Gold, Platin, Silber, Karbon oder anderen dem Fachmann bekannten Materialien oder Mischungen, z. B. auch Dickschichtpasten, bestehen. Bevorzugt werden auf die Oberflächen der Arbeitselektroden die Fänger-Oligonukleotide für die nachzuweisenden Sequenzen fixiert. Bevorzugt kann dies durch Adsorption, Bindung über reaktive Gruppen oder durch die Fixierung an eine Polymermatrix erfolgen. Selbstverständlich ist es auch möglich, Leiterbahnen, beispielsweise aus einem Silberplatingemisch, einem Karbonplatingemisch oder aus Kohlenstoffgemischen zu verwenden, wobei die Isolierung der Elektroden insbesondere mit einem Epoxidharz oder durch andere Lacke erfolgt: Es ist bevorzugt, neben den Arbeitselektroden auch Referenz-Elektroden zu verwenden, die insbesondere aus Platin, Silber, Silber/Silberchlorid oder anderen dem Fachmann bekannten Materialien bestehen können.

[0027] Bei der Herstellung von Ultra-Mikroelektroden und Ultra-Mikroelektroden-Arrays (UMA) sind Arbeitselektroden mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern oder kleiner bevorzugt, da solche Mikro- bzw. Ultra-Mikroarbeitselektroden aus analytischer Sicht vorteilhafte Eigenschaften aufweisen. Vorteilhaftesten bestehen qualitative Unterschiede zwischen Elektroden und Mikroelektroden, die durch die Verringerung der Elektrodenfläche bedingt sind. Diese sind beispielsweise die Verringerung des Einflusses von konvektiven Flüssigkeitsströmungen auf das Elektrodensignal. Die an Mikroelektroden auftretenden Kapazitäten sind vorteilhaftesten sehr klein und demgemäß sind die korrespondierenden Ladeströme zumeist so unbedeutend, dass elektrochemische Prozesse, wie sie durch die zwei Hybridisierungsreaktionen verursacht werden bzw. die elektrochemisch aktiven Marker bzw. Substrate/Produkte der Reaktion des Markers, gut detektiert werden können. Die Massentransportrate nimmt mit dem abnehmenden Elektrodenradius zu, wodurch der Strom einen stationären Zustand erreicht. Da die kapazitiven Ströme an Mikroelektroden vorteilhaftesten zugleich verringert sind, wird so eine deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erzielt, so dass die elektrochemische Reaktion zum Nachweis redoxaktiver Marker bzw. Substrate/Produkte des Markers mit einem guten Signal detektiert werden kann. Vorteilhaft sind die hohen Stromdichten an Mikroelektroden. Die Mikroelektroden haben den Vorteil, mit geringem Probenvolumen zu arbeiten.

[0028] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, werden die Arbeitselektroden mit einer Gegenelektrode und/oder Referenzelektrode verwendet. Durch den Einsatz von Arbeitselektroden, insbesondere von mindestens zwei Arbeitselektroden, mit der Gegenelektrode und/oder der Referenzelektrode ist es möglich, Störungen der Messung weitestgehend zu vermeiden. Bei einer elektrochemi-

schen Detektion der Marker kann beispielsweise auch vorgesehen sein, dass nur ein Teil der Elektroden die Fänger-Oligonukleotide umfasst und ein anderer Teil nicht. Die verschiedenen Elektroden können dann mit der Probenflüssigkeit, welche die nachzuweisenden Target-Nachweis-Oligonukleotide enthält, in Kontakt gebracht werden. Auf diese Weise können Interferenzen, die aus der Wechselwirkung störender Substanzen in der Probe mit der unbedeckten Elektrode resultieren, erfasst werden.

[0029] Durch das Zusammenwirken von Arbeitselektrode-Referenzelektrode und/oder Gegenelektrode können beispielsweise wichtige Größen, wie insbesondere das Konstanthalten der angelegten Spannung, vorteilhaftesten optimiert werden. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn bei enzymatischen Prozessen pH-Wert-Änderungen und andere Modifikationen im System zu Störungen innerhalb der Zwei- oder Drei-Elektroden-Systeme – je nachdem, ob mit einer Gegen- oder Referenzelektrode oder mit beiden im Zusammenhang mit einer Arbeitselektrode gearbeitet wird – führen können. Als Gegenelektrode können hierbei beispielsweise dem Fachmann bekannte Edelstahlelektroden oder Platin, Kohlenstoff, Metall-Gemische oder Dickschichtpasten verwendet werden. Als Arbeitselektrode können neben den oben genannten bevorzugt Gold-, Kupfer-, Nickel-, Titan-, Blei-, Bleigraphit-Elektroden bzw. Mischungen der genannten Metalle oder Mischungen in Dickschichtpasten verwendet werden. Selbstverständlich können die Metalle auch aufgedampft werden.

[0030] Mit Vorteil können Arbeitselektroden verwendet werden, bei denen im polarisierten Zustand in einem bestimmten Potentialbereich kein Ladungstransfer zwischen der Metallocberfläche und der angrenzenden Probenlösung stattfindet.

[0031] Demgemäß können nichtpolarisierbare Elektroden, die ihr Potential bei unterschiedlichen Strömen nicht verändern, insbesondere als Referenzelektroden eingesetzt werden. Um vor allem einen hohen Widerstand und somit einen Spannungsabfall im Zusammenhang mit einer Zerstörung der Referenzelektrode bei hohen Messströmungen vorzubeugen, ist eine Anordnung vorteilhaft, in der der Strom über die Arbeitselektrode und eine zusätzliche Gegenelektrode geführt wird, während die als Bezugselektrode fungierende Referenzelektrode aufgrund ihrer hohen Impedanz nahezu stromlos bleibt.

[0032] Besonderes vorteilhaft ist es, wenn alle Arbeitselektroden auf die gleiche Spannung polarisiert werden können, weil die elektrochemische Nachweisreaktion an allen Elektroden gleich ist. Dadurch können Störungen vermieden werden, die bei der Verwendung mehrerer unterschiedlicher Polarisationsspannungen für mehrere Arbeitselektroden mit einer gemeinsamen Gegenelektrode sowie einer gemeinsamen Referenzelektrode auftreten würden.

[0033] Die Erfindung betrifft auch einen Kit umfassend mindestens (a) eine Elektrode und/oder einen

Elektrodenarray, (b) ein Fänger-Oligonukleotid, (c) eine Target-Nukleinsäure, (d) eine Nachweisequenz für die Target-Nukleinsäure und/oder (e) ein Marker-Oligonukleotid. In dem Kit können die Komponenten (a), (b), (c), (d) und/oder (e) getrennt oder in Kombination vorliegen. Der Kit kann z.B. aus mehreren Sets bestehen, wobei in jedem Set jeweils mindestens eine Komponente gemäß (a) bis (e) enthalten ist, wobei nicht alle Komponenten, wie z.B. die Target-Nukleinsäure, Bestandteil des Kits sein müssen. Dem Fachmann ist durch die Offenbarung des erfindungsgemäßen Verfahrens bekannt, wie er die einzelnen Komponenten gemäß (a) bis (e) in Kontakt bringen muss, um eine Target-Nukleinsäure nachzuweisen.

[0034] Selbstverständlich kann auch vorgesehen sein, dass mehrere Komponenten in dem Kit bereits in Kontakt gebracht sind, z.B. kann das Fänger-Oligonukleotid an die Elektrode und/oder den Elektrodenarray gebunden sein; es ist auch möglich, dass weitere Komponenten nach (a) bis (e) kombiniert oder in einer Teilkombination in dem Kit vorliegen. Es ist daher auch möglich, dass eine bestimmte Komponente kein Bestandteil des Kits ist. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn nur die Komponenten gemäß (b), (d) und (e) Bestandteil des Kits sind und die Elektrode durch den Anwender bereitgestellt wird. Selbstverständlich ist es möglich, dass der Kit insbesondere die Elektrode und das Fänger-Oligonukleotid oder die Elektrode, das Fänger-Oligonukleotid und das Marker-Oligonukleotid getrennt oder in Kombination bzw. Teilkombination – bereits in Kontakt gebracht – umfasst. Dem Fachmann ist bekannt, dass der Kit weitere Komponenten wie Primer, beispielsweise Universalprimer oder Binde-Moleküle für die Immobilisierung umfassen kann.

[0035] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Kits zum Nachweis einer Target-Nukleinsäure in einer Probe. Diese Probe ist insbesondere eine biologische/chemische Probe wie z.B. ein Lebensmittel, eine Abwasser- oder Trinkwasserprobe, Blut oder Serum, eine Gewebeprobe oder anderes; es wird auf die obigen Ausführungen zu der Zusammensetzung der möglichen Proben verwiesen.

[0036] Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

Beispiel

[0037] Das Verfahren wurde für die Kontrolle von Wässern auf die Anwesenheit von Pathogenen genutzt. Es gibt verschiedene Leit-Keime, deren Anwesenheit in Wässern auf eine Verunreinigung mit Mikroorganismen hinweisen, wie Coliforme, Fäkalstrep-tokokken, Clostridier, Salmonellen, deren Anwesenheit untersucht wurde. Der Nachweis dieser Keime erfolgt bisher mittels Methoden, die meist einen Schritt der Kultivierung der Keime einschließen. Dadurch wird einerseits für die Methoden ein hoher Ar-

beits- und Zeitaufwand erforderlich, andererseits können nur kultivierbare Keime nachgewiesen werden, weshalb sich die bisherigen Nachweismethoden bisher auf die kultivierbaren Leitkeime beschränken. Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens (siehe Fig. 1) mit einem DNA-Sensor bzw. DNA-Array-Sensor (Fig. 2) ist von Vorteil, weil damit parallel verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen werden können, die zudem nicht kultivierbar sein müssen, denn ein Kultivierungsschritt ist in dieser Methode nicht erforderlich. Dadurch werden zusätzliche Mikroorganismen überhaupt erst nachweisbar und es entsteht auch ein Vorteil bezüglich des erforderlichen Zeitaufwands.

Patentansprüche

1. Verfahren zur simultanen Detektion unterschiedlicher Target-Nukleinsäuren in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:
 - kovalentes Koppeln einer im Wesentlichen einheitlichen Nachweisequenz an die unterschiedlichen Target-Nukleinsäuren, wodurch Target-Nachweis-Oligonukleotide entstehen, wobei diese zumindest in einem Teilbereich identisch sind,
 - in Kontakt bringen der Target-Nachweis-Oligonukleotide mit mindestens einer Elektrode oder einem Elektrodenarray umfassend targetspezifische, komplementäre Fänger-Oligonukleotide, die auf den Elektroden oder dem Elektrodenarray fixiert sind, wobei die Target-Nachweis-Oligonukleotide in einer ersten Hybridisierungsreaktion an die komplementären Fänger-Oligonukleotide binden,
 - Zugabe eines im Wesentlichen einheitlichen Marker-Oligonukleotids umfassend eine zur Nachweisequenz komplementäre Sequenz und ein Marker-Molekül, wobei in einer zweiten Hybridisierungsreaktion das Marker-Oligonukleotid an alle in der ersten Reaktion gebundenen Nachweisequenzen bindet,
 - Detektion des Markers.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das kovalente Koppeln einer Nachweisequenz an die potentiellen Target-Nukleinsäuren in einer PCR durch die Verwendung von Primern erfolgt, wobei einer der Primer an seinem 5'-Ende mit der nichtprimenden Nachweisequenz modifiziert ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Marker ein redoxaktives Molekül, Enzym und/oder Enzymsystem eingesetzt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden als Arbeitselektroden einzeln oder auf einem Array oder Träger angeordnet werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden

mit einer Gegenelektrode und/oder Referenzelektrode verwendet werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass alle Arbeitselektroden auf die gleiche Spannung polarisiert werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung über den elektrochemischen Nachweis der Oxidation/Reduktion des Markers an der/den Elektroden erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung nach Zugabe von Substrat über den elektrochemischen Nachweis von Bildung/Verbrauch von (Co)Substanzen/Produkten einer enzymatischen Reaktion erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass eine verstärkend wirkende Enzymsequenz für die Nachweisreaktion verwendet wird.

10. Kit umfassend mindestens (a) eine Elektrode und/oder einen Elektrodenarray, (b) ein Fänger-Oligonukleotid, (c) eine Target-Nukleinsäure, (d) eine Nachweissequenz für die Target-Nukleinsäure und/oder (e) ein Marker-Oligonukleotid.

11. Verwendung eines Kits nach Anspruch 10 zum Nachweis von einer Target-Nukleinsäure in einer Probe.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

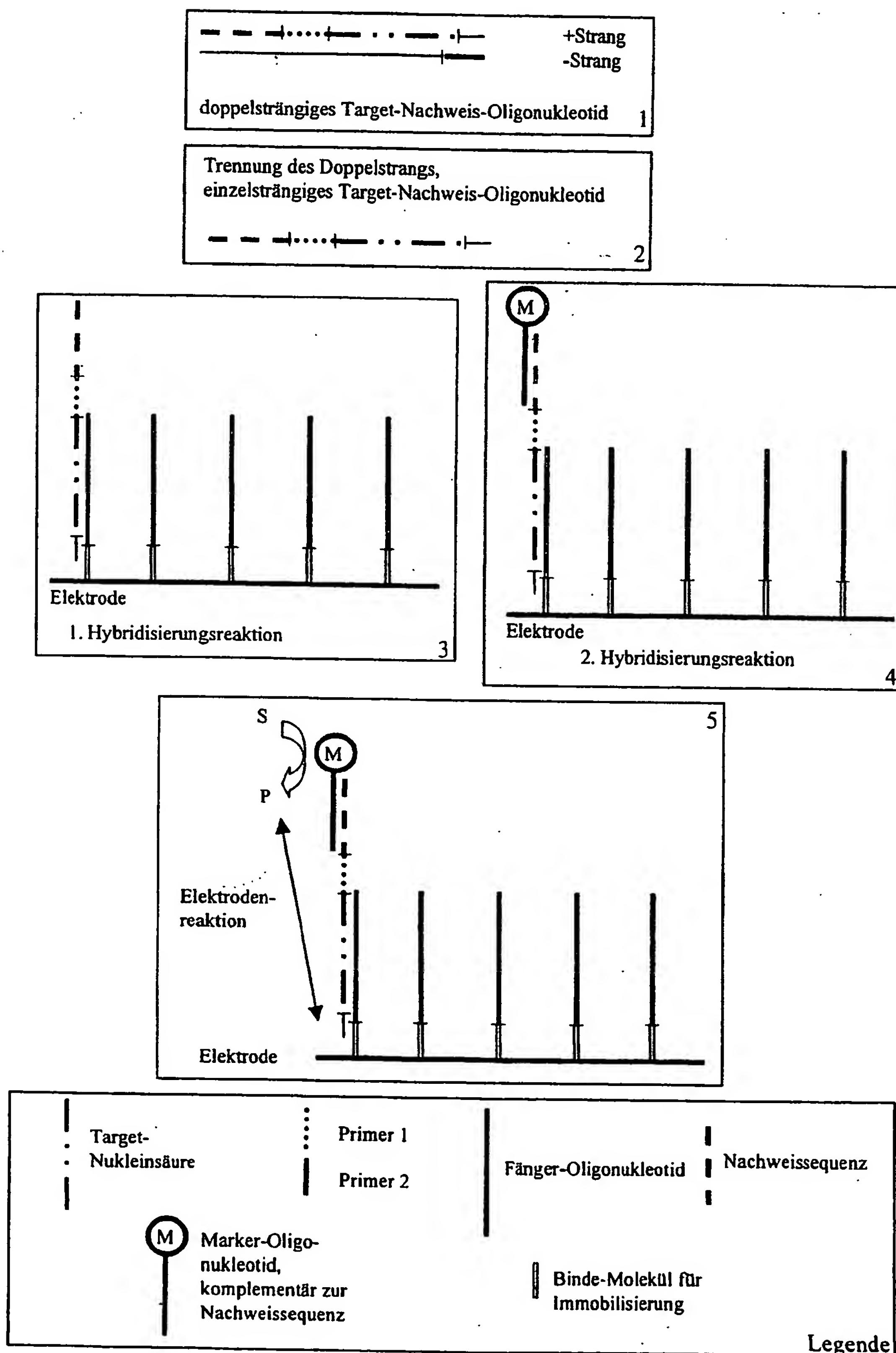


Abb. 1: Beispiel für Nachweisprinzip

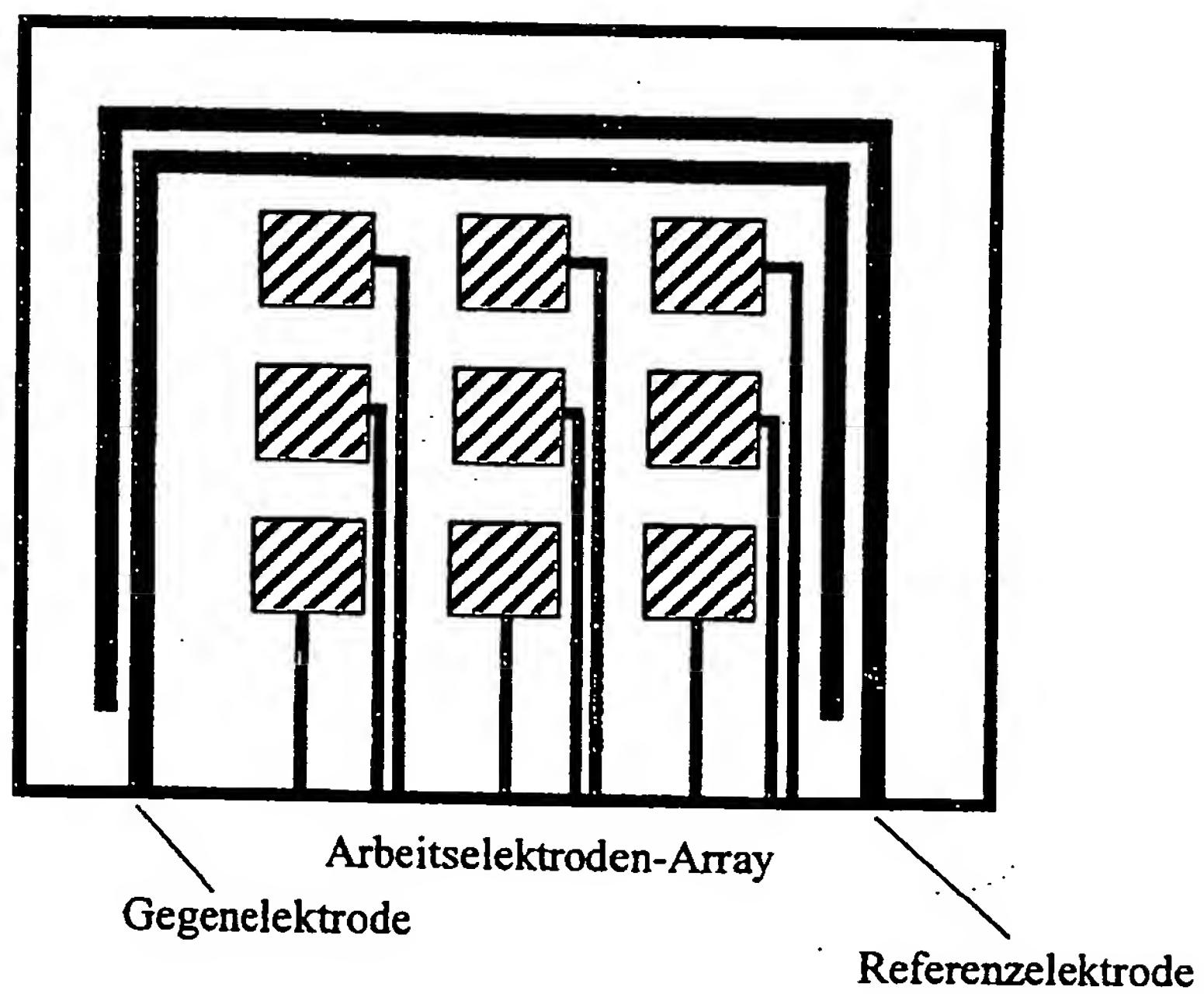


Abb. 2: Array-Elektroden-Prinzip

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.